|  |  |
| --- | --- |
| Якорцев стелющихся травы  экстракт сухой  *Tribuli terrestris herbae extractum siccum* | **ФС**  **Вводится впервые** |

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Якорцев стелющихся травы экстракт сухой, получаемый из собранных во время цветения и плодоношения и высушенной травы с корнями дикорастущего и культивируемого однолетнего растения якорцев стелющихся - *Tribulus* *terrestris* L., сем. парнолистниковых - *Zygophyllaceae*, экстракцией спиртом 70 % при соотношении сырья к экстракту 35-45:1, применяемый для производства лекарственных препаратов.

**Описание**

Порошок от светло-коричневого до коричневого цвета с характерным запахом.

\*Гигроскопичен, комкуется.

**Подлинность**

***Тонкослойная хроматография***

*Приготовление растворов*

*Раствор стандартного образца (СО) протодиосцина.* Около 0,004 г СО протодиосцина растворяют в 10 мл метанола и перемешивают. Срок годности раствора не более 6 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

0,2 г субстанции помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 50 мл, прибавляют 10 метанола и растворяют в ультразвуковой бане в течение 15 мин. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр "синяя лента".

На линию старта хроматографической пластинки со слоем силикагеля по 10 мкл испытуемого раствора и раствора СО протодиосцина. Пластинку с нанесенными пробами сушат до удаления следов растворителей, затем помещают в хроматографическую камеру со смесью растворителей бутанол - уксусная кислота ледяная - вода (40 : 10 : 20), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей. Пластинку обрабатывают диметиламинобензальдегида спиртовой раствор в хлористоводородной кислоте или раствором диметиламинобензальдегида 1 % выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100-105 ºС в течение 3-5 мин и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО протодиосцина должна обнаруживаться зона адсорбции розового цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции розового цвета на уровне зоны адсорбции СО протодиосцина; допускается обнаружение других зон адсорбции (фуростаноловые гликозиды).

**Остаточные органические растворители.** В соответствии с требованиями ОФС «Остаточные органические растворители**»**. Содержание 2-пропанола должно бытьне более 0,3 %; этанола - не более 0,3 %; бутанола - 0,5 %, хлороформа - не более 0,006 %.

*Приготовление растворов*.

*Раствор внутреннего стандарта*. Около 1,0 мл ацетонитрила помещают в мерную колбу вместимостью 500 мл, растворят в 100 мл воды, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленный.

*Стандартный раствор.* 10,0 мл 2-пропанола, 10,0 мл этанола, 10,0 мл бутанола и 0,1 мл хлороформа помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, растворяют в 100 мл воды, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 6,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют 50 мл воды, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Содержание растворителя (а0) в 1 мл стандартного раствора в мл составляет: 2-пропанол - 1,884, этанол - 1,894, бутанол - 1,943, хлороформ - 0,036. Раствор используют свежеприготовленный.

*Рабочий стандартный раствор.* 1,0 мл стандартного раствора помещают в виалу для парофазного анализа вместимостью 20 мл, прибавляют 1,0 мл 1,0 мл раствора внутреннего стандарта и закрывают крышкой. Отбор пробы для хроматографирования из виалы производят однократно. Раствор используют свежеприготовленный.

Рабочий стандартный раствор хроматографируют, получая не менее 3 хроматограмм.

*Проверка пригодности хроматографической системы.*

Результаты анализа считаются достоверными, если для хроматограммы рабочего стандартного раствора выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику 2-пропанола, должна быть не менее 5000 теоретических тарелок;

- разрешение между пиками этанола и 2-пропанола должно быть не менее 1,2;

- относительное стандартное отклонение отношения площади пика 2-пропанола к площади пика внутреннего стандарта (ацетонитрила), рассчитанное для трех последовательных хроматограмм, не более 5 %.

Около 0,6 г (точная навеска) субстанции помещают в виалу для парофазного анализа вместимостью 20 мл, прибавляют 1,0 мл воды, 1,0 мл раствора внутреннего стандарта и закрывают крышкой (испытуемый раствор). Отбор пробы для хроматографирования из виалы производят однократно.

*Хроматографические условия*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Колонка капиллярная | | 30 м × 0,32 мм, поли[(цианопропил)(фенил)][диметил] силоксан, толщина слоя 1,8 мкм |
| Подвижная фаза | | гелий |
| Деление потока | | 1:10 |
| Скорость подвижной фазы, мл/мин | | 1,5 |
| Детектор | | Пламенно-ионизационный |
| Объем вводимой пробы, мкл | | 1000 |
| Время хроматографирования, мин. | | 15 |
| Температура | | |
|  | Время, мин | Температура, °C |
| Колонка | 0-3  3 - 11  11 - 15 | 40  40 → 200 (23 °С/ мин)  200 |
| Инжектор |  | 250 |
| Детектор |  | 300 |

*Условия термостатирования образца:*

|  |  |
| --- | --- |
| Температура печи | 75 °С |
| Температура шприца | 75 °С |
| Время термостатирования | 30 мин |

Порядок выхода пиков: 1 - 2-пропанол, 2 - этанол, 3 - ацетонитрил, 4 - хлороформ, 5 - бутанол.

Испытуемый раствор хроматографируют, получая не менее 3 хроматограмм.

Содержание каждого растворителя в субстанции в миллионных долях (Х) вычисляют по формуле:

*,*

где: - отношение площади пика растворителя к площади пика внутреннего стандарта на хроматограмме испытуемого раствора;

*Sо* - отношение площади пика растворителя к площади пика внутреннего стандарта на хроматограмме рабочего стандартного раствора;

*ао* - содержание растворителя в 1 мл стандартного раствора, мл;

*а* - навеска субстанции, г;

Р - содержание основного вещества в соответствующем растворителе, взятом для приготовления стандартного раствора, %.

**Потеря в массе при высушивании.** Не более 5,0 %. В соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании**».**

**Тяжелые металлы.** Не более 0,01 %. В соответствии с требованиями ОФС «Экстракты».

**Микробиологическая чистота.** В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

**Количественное определение.**

Содержание суммы фуростаноловых гликозидов в пересчете на протодиосцин и сухое вещество в субстанции должно быть не менее 45 %.

*Приготовление растворов*.

*Раствор хлористоводородной кислоты в метаноле.* 25,0 мл хлористоводородной кислоты концентрированной осторожно смешивают с 50,0 мл метанола и охлаждают до комнатной температуры. Раствор используют свежеприготовленным.

*Диметиламинобензальдегида раствор 1 %.* 0,5 г диметиламинобензальдегида помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 25 мл раствора хлористоводородной кислоты в метаноле, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

*Раствор кобальта хлорида гексагидрата*. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают навеску кобальта хлорида гексагидрата, соответствующую 5,000 г основного вещества. Прибавляют 50 мл воды, 1 каплю хлористоводородной кислоты концентрированной, перемешивают до растворения, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

*Калибровочные растворы кобальта хлорида гексагидрата.* В отдельные мерные колбы вместимостью 25 мл помещают: 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0 мл раствора кобальта хлорида гексагидрата. Доводят объем раствора в каждой колбе водой до метки и перемешивают. Содержание кобальта хлорида гексагидрата в калиброванных растворах: 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0 мг/мл. Растворы используют свежеприготовленными.

*Построение калибровочного графика.* Оптическую плотность измеряют калиброванных растворов кобальта хлорида гексагидрата на спектрофотометре при длине волны 515 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют воду.

Строят калиброванный график, откладывая по оси абсцисс значение концентрации калиброванных растворов (мг/мл), а по оси ординат соответствующие им значения оптической плотности. Построение калибровочного графика проводят с периодичностью 1 раз в 3 мес.

*Условия термостатирования.* Термостат заполняют водой и нагревают до температуры 58 + 0,5 оС. Температуру в заданном интервале поддерживают в течение всего испытания. При проведении испытания следят, чтобы уровень воды в термостате был выше уровня реакционной смеси в термостатических колбах.

Около 0,05 г (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 60 мл метанола, закрывают пробкой и интенсивно перемешивают в течение 15 мин. Объем раствора в колбе доводят метанолом до метки, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр "синяя лента", накрывая воронку часовым стеклом, первые 10 мл фильтрата отбрасывают.

В две мерные колбы вместимостью 25 мл помещают: в первую - 10,0 мл фильтрата, а во вторую - 10,0 мл метанола. В каждую колбу прибавляют по 10,0 млдиметиламинобензальдегида раствора 1 %, перемешивают в течение 2 мин, закрывают пробками, затем помещают в заранее подготовленный термостат и выдерживают в течение 2 ч.

Колбу охлаждают под проточной водой, выдерживают при комнатной температуре в течение 5 мин, доводят объем раствора в каждой колбе метанолом до метки и перемешивают. В результате получают в первой колбе испытуемый раствор, а во второй - раствор сравнения.

Через 5 мин измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 515 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, относительно раствора сравнения.

По оси ординат калиброванного графика откладывают значение оптической плотности испытуемого раствора и по калибровочной кривой на оси абсцисс определяют концентрацию кобальта хлорида гексагидрата (С).

Содержание суммы фуростаноловых гликозидов в пересчете на протодиосцин и сухое вещество в субстанции в процентах (Х) вычисляют по формуле:

,

где: *С* − количество кобальта хлорида гексагидрата, соответствующее 1 мл испытуемого раствора, найденное по калибровочному графику, в мл;

а − навеска субстанции, г;

0,00566 - коэффициент пересчета кобальта хлорида гексагидрата в протодиосцин;

*W* – потеря в массе при высушивании, %.

**Хранение.** В защищенном от света месте при температуре не выше 25оС.